

日本国特許庁 PCT/JP 03/11974
JAPAN PATENT OFFICE

19.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2002年 9月20日
Date of Application:

出願番号 特願2002-275264
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP 2002-275264]

出願人 杉山 治夫
Applicant(s): 中外製薬株式会社
住友製薬株式会社

RECD 06 NOV 2003
WTO PCT

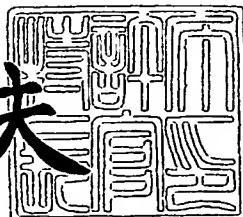
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月23日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 185831
【提出日】 平成14年 9月20日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
A61K 35/12

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 後藤 正志

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 高須 秀夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 三溝 文雄

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 楠瀬 直人

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 中塙 正志

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西2-19-30

【氏名】 杉山 治夫

【特許出願人】

【識別番号】 595090392

【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西2-19-30

【氏名又は名称】 杉山 治夫

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葵

【選任した代理人】

【識別番号】 100086405

【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100103230

【弁理士】

【氏名又は名称】 高山 裕貢

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0203207

【包括委任状番号】 9809450

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 WT1置換型ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のアミノ酸配列：

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：4)、

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：5)、

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：6)、および

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

のなかから選ばれるいづれかの配列を含むアミノ酸配列を有するペプチド（ここに、Abuは α -アミノ酪酸である）。

【請求項2】 配列番号：3、4、5、6および7のなかから選ばれるいづれかのアミノ酸配列からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項3】 請求項1または2記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項3記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

【請求項5】 請求項4記載の発現ベクターを含有する細胞。

【請求項6】 請求項5記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、請求項1または2記載のペプチドの製造方法。

【請求項7】 請求項1または2記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項8】 請求項1記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞。

【請求項9】 請求項2記載のペプチドからなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている、請求項8記載の抗原提示細胞。

【請求項10】 請求項1記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL。

【請求項11】 請求項2記載のペプチドからなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識する、請求項10記載のCTL。

【請求項12】 請求項1または2記載のペプチド、請求項3記載のポリヌ

クレオチド、請求項4記載の発現ベクター、請求項5記載の細胞、請求項8または9記載の抗原提示細胞、あるいは請求項10または11記載のCTLと、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物。

【請求項13】 癌ワクチンとして使用される、請求項12記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なWT1置換型ペプチドに関する。より詳細には、本発明は、システイン残基を特定のアミノ酸残基に置換した新規なWT1置換型ペプチド、および当該ペプチドの癌ワクチンとしての使用などに関する。

【0002】

【従来の技術】

ペプチドに含まれるシステイン残基は溶液中で酸化されジスルフィド結合を生じる場合がある。還元型システイン残基を含むペプチドと酸化を受けたシステイン残基を含むペプチドとでは構造が大きく異なり、それらを癌ワクチンとして用いても、一方に特異的なCTLが他方に全く反応しないことがある(Immunity 1997; 6: 273-281)。よって、システイン残基を含む癌抗原ペプチドを癌ワクチン療法剤として開発する場合、ペプチドに含まれるシステイン残基を他のアミノ酸残基に置換したペプチドを代替品として開発することは、一つの有効な手段と考えられる。しかしながら、システイン残基を他のアミノ酸残基へ置換したペプチドが必ずしも癌抗原ペプチドとして機能するとは限らず、その有効性は個々の置換ペプチドによって大きく異なる(J. Immunol., 1998; 161:6985-6992(非特許文献1)、J. Immunol., 1998; 160:2099-2106(非特許文献2))。

【0003】

癌抗原タンパク質WT1(配列番号: 1、Cell., 60:509, 1990(非特許文献3))の第235位-第243位よりなるペプチドであるWT1₂₃₅₋₂₄₃は、HLA-A24拘束性のCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドである。このWT1₂₃₅₋₂₄₃の第2位のメチオニンをチロシンに改変した改変ペプチド(Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-A

sn-Leu；配列番号：2、以下、当該改変ペプチドを WT1₂₃₅₋₂₄₃(2M→Y)と称する場合もある)は、前記天然型ペプチドに比してHLA-A24抗原への高い結合性を有しており(PCT/JP02/02794、国際出願日：2002年3月22日(優先日：2001年3月22日)）、当該改変ペプチドWT1₂₃₅₋₂₄₃(2M→Y)が癌免疫療法剤として開発されている。

【0004】

この改変ペプチドは第1位にシステイン残基を含有するものであるが、当該システイン残基の置換については何も知られていない。今まで、癌抗原ペプチド全般に関して、置換(改変)を有するペプチドのシステイン残基をさらに他のアミノ酸残基に置換した例は報告されていない。また、WT1₂₃₅₋₂₄₃(2M→Y)の第1位のシステイン残基を他のアミノ酸に残基に置換することによりCTL誘導活性や交差反応性が保持されるかどうかは不明である。

【非特許文献1】

J. Immunol., 1998; 161:6985-6992

【非特許文献2】

J. Immunol., 1998; 160:2099-2106)

【非特許文献3】

Cell., 60:509, 1990

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、システイン残基を特定のアミノ酸残基に置換した新規なWT1置換型ペプチド、および当該ペプチドの癌ワクチンとしての使用などを提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、WT1₂₃₅₋₂₄₃(2M→Y)（以下本ペプチドを「非置換型ペプチド」とも称する）の第1位のシステイン残基を種々のアミノ酸残基と置換し、イン・ビボでの免疫原性についてHLA-A24⁰²/K^bトランスジェニックマウス（以下HLA-A24発現トランスジェニックマウスとも称する）を用いて検討した。

更に、置換型ペプチドで誘導した特異的CTLの非置換型ペプチドとの交差反応性を検討した。その結果、セリン残基、アラニン残基、 α -アミノ酪酸、アルギニン残基あるいはリジン残基に置換した置換型ペプチド（配列番号：3～7）が非置換型ペプチドと同等のCTL誘導活性（免疫原性）を保持し、かつ非置換型ペプチドとの交差反応性をも保持するという効果を有することを見出した。これらの知見から、本発明者らは、前記置換型ペプチド（配列番号：3～7）は癌ワクチンとして種々の形態で利用可能であるとの確信を得た。これら置換型ペプチドはシステイン残基を含有しないペプチドであるためジスルフィド結合を生じ得ず、よって医薬品としての規格化が容易である等の利点を有する。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0007】

すなわち本発明は、

（1） 以下のアミノ酸配列：

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）、

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：4）、

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：5）、

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：6）、および

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：7）

のなかから選ばれるいずれかの配列を含むアミノ酸配列を有するペプチド（ここに、Abuは α -アミノ酪酸である）、

（2） 配列番号：3、4、5、6および7のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる、前記（1）記載のペプチド、

（3） 前記（1）または（2）記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

、

（4） 前記（3）記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、

（5） 前記（4）記載の発現ベクターを含有する細胞、

（6） 前記（5）記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、前記（1）または（2）記載のペプチドの製造方法、

（7） 前記（1）または（2）記載のペプチドに特異的に結合する抗体、

(8) 前記(1)記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、

(9) 前記(2)記載のペプチドからなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている、前記(8)記載の抗原提示細胞、

(10) 前記(1)記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL、

(11) 前記(2)記載のペプチドからなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識する、前記(10)記載のCTL、

(12) 前記(1)または(2)記載のペプチド、前記(3)記載のポリヌクレオチド、前記(4)記載の発現ベクター、前記(5)記載の細胞、前記(8)または(9)記載の抗原提示細胞、あるいは前記(10)または(11)記載のCTLと、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、ならびに

(13) 癌ワクチンとして使用される、前記(12)記載の医薬組成物、に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

(I) 本発明のペプチド

本発明のペプチドは、ヒトWT1 (Cell., 60:509, 1990, NCBIデータベースAccession No.XP_034418、配列番号：1) に由来し、HLA-A24拘束性のCTL誘導活性（免疫原性）を有する。

本発明のペプチドは、抗原提示細胞内にて要すればプロセッシングを受け、生じた癌抗原ペプチドが抗原提示細胞に提示され、HLA-A24抗原拘束性にCTLを誘導するという特性を有するものである。当該特性は、W002/47474号公報およびInt J. Cancer:100, 565-570 (2002) に記述されたHLA-A24モデルマウスを用いることなどにより調べることができる。

【0009】

配列番号：3～7のなかから選ばれるいづれかの配列を含むアミノ酸配列を有する本発明ペプチドは、本発明ペプチド由来の癌抗原ペプチドが抗原提示細胞に提示され、CTLを誘導するという特性を有する限り、何ら制限されないが、その

長さは通常連続する9~100アミノ酸であり、より好ましくは連続する9~50アミノ酸である。ここに、癌抗原ペプチドとは、抗原提示細胞に提示される、CTL誘導活性を導くペプチドとして定義される。

【0010】

本発明ペプチドは、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis），Interscience, New York, 1966；ザ・プロテインズ（The Proteins），Vol 2, Academic Press Inc. , New York, 1976；ペプチド合成，丸善（株），1975；ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株），1985；医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成，広川書店，1991）などに記載されている方法が挙げられる。

【0011】

また本発明のペプチドは、本発明ペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することができる。当該DNA合成や各種プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収などの操作は、当業者に周知の方法、文献記載の方法（Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory(1983)、DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS(1985)）、あるいは後述の（II）項に記載の方法などに準じて行うことができる。

【0012】

以下、本発明のペプチドについてより詳細に説明する。

本発明は前述のように、WT1由来の改変ペプチドであるWT1235-243(2M→Y)（配列番号：2）の第1位のシステイン残基をセリン、アラニン、 α -アミノ酪酸、アルギニンあるいはリジンに置換した置換型ペプチド（配列番号：3~7）が、イン・ビボにてCTL誘導活性を有するという新たな知見を得たことに基づく。これら置換型ペプチドのいずれかを含有する本発明のペプチドは、癌免疫療法におけるCTL誘導剤の有効成分として、また癌ワクチンの有効成分として有用である。

【0013】

本発明のペプチドとして、より具体的には以下の(1-1)~(1-4)に挙げるペプチ

ドを例示することができる。

【0014】

(1-1) 配列番号：3～7のなかから選ばれるいづれかのアミノ酸配列からなるペプチド

配列番号：3～7のいづれかのアミノ酸配列からなるペプチドの具体例として、以下に示す癌抗原ペプチドを例示することができる：

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3) からなる癌抗原ペプチド、

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：4) からなる癌抗原ペプチド、

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：5) からなる癌抗原ペプチド、

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：6) からなる癌抗原ペプチド、および

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7) からなる癌抗原ペプチド。

【0015】

これらのペプチドは、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、WO 02/47474 号公報および Int J. Cancer:100, 565-570 (2002) に記述のヒトモデル動物に供すること等によりCTL誘導活性を測定することができる。

【0016】

(1-2) 配列番号：3～7のいづれかの配列を含むアミノ酸配列を有する、モチーフ構造を保持するペプチド

HLA分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性（結合モチーフ）が存在することが知られている。HLA-A24の結合モチーフとしては、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン (Tyr) 、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met) またはトリプトファン (Trp) であり、C末端のアミノ酸がフェニル

アラニン(Phe)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、トリプトファン(Trp)またはメチオニン(Met)となることが知られている (J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994)。

【0017】

従って、この規則性に基づいた本発明のペプチドの具体例として次のもの：

以下に示される9アミノ酸からなる本発明の癌抗原ペプチド；

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：4)、

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：5)、

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：6)、

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

のC末端に、Phe、Leu、Ile、TrpまたはMetを付加した10アミノ酸からなるペプチド、あるいは当該10アミノ酸からなるペプチドのC末端にさらにPhe、Leu、Ile、TrpまたはMetを付加した11アミノ酸からなるペプチドであって、CTL誘導活性を有する当該ペプチド、が例示される。これらのペプチドも、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、WO 02/47474 号公報および Int J. Cancer:100, 565-570 (2002) に記述のヒトモデル動物に供すること等によりCTL誘導活性を測定することができる。

【0018】

(1-3) 配列番号：3～7のいずれかの配列を含むアミノ酸配列を有するエピトープペプチド

近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したペプチド（エピトープペプチド）が、効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHL-A-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープを連結した約30merのペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。

【0019】

またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたペプチド（エピトー

ペプチド)により、効率的にCTLが誘導されることも示されている。ここでヘルパーエピトープとはCD4陽性T細胞を活性化させる作用を有するペプチドを指すものであり(Immunity., 1:751, 1994)、例えばB型肝炎ウイルス由来のHBVc128-140や破傷風毒素由来のTT947-967などが知られている。当該ヘルパーエピトープにより活性化されたCD4陽性T細胞は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター活性化などの作用を発揮するため、抗腫瘍免疫応答に重要であると考えられている。このようなヘルパーエピトープとCTLエピトープとを連列したペプチドの具体例として、例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープより構成されるペプチドをコードするDNA(ミニジーン)が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。また実際に、CTLエピトープ(メラノーマ抗原gp100の第280位～288位からなる癌抗原ペプチド)とヘルパーエピトープ(破傷風毒素由来Tヘルパーエピトープ)とを連結したペプチドが臨床試験に供されている(Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024)。

【0020】

従って、前記(1-1)や(1-2)に記述したような本発明の癌抗原ペプチドを含む複数のエピトープを連結したペプチド(エピトープペプチド)であってイン・ビボでCTL誘導活性を有するペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。

ここで、本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがCTLエピトープの場合、用いるCTLエピトープとしては、WT1由来のHLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などに拘束性のCTLエピトープが挙げられる。これらCTLエピトープは複数個連結することが可能であり、1つのCTLエピトープの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により(Immunogenetics, 41:178, 1995)、8～14アミノ酸程度を挙げることができる。

【0021】

また本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがヘルパーエピトープの場合、用いるヘルパーエピトープとしては、前述のようなB型肝炎ウイルス由来のHBVc128-140や破傷風毒素由来のTT947-967などが挙げられる。また当該ヘルパーエピトープの長さとしては、13~30アミノ酸程度、好ましくは13~17アミノ酸程度を挙げることができる。

【0022】

本発明のエピトープペプチドとして、より具体的には、例えば配列番号：3~7のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とヘルパーエピトープとを連結させたペプチドを挙げることができる。より具体的には、例えば配列番号：3~7のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上と破傷風毒素由来のヘルパーペプチド（例えばPhe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu;配列番号：8）とを連結させたペプチドや、配列番号：3~7のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とAla Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu（配列番号：9、Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024）とを連結させたペプチドなどが挙げられる。

【0023】

このような複数のエピトープを連結させたペプチド（エピトープペプチド）は、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを回収することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983)、DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS(1985))や後述の(I I).項に記載の方法などに準じて行うことができる。

【0024】

以上のようにして製造された複数のエピトープを連結させたエピトープペプチ

ドをWO 02/47474 号公報および Int J. Cancer:100, 565-570 (2002) に記述のヒトモデル動物に供すること等によりCTL誘導活性を測定することができる。

【0025】

(1-4) 配列番号：3～7のいずれかの配列を含むアミノ酸配列からなり、N末端アミノ酸のアミノ基またはC末端アミノ酸のカルボキシル基が修飾されたペプチド
前記(1-1)～(1-3)に例示したような本発明のペプチドのN末端アミノ酸のアミノ基、またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾することも可能である。

【0026】

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1～3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロアルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数1から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

【0027】

以上のような本発明のペプチドは、例えば、①後述するCTLの誘導剤、癌ワクチンの有効成分として、また②後述する抗原提示細胞の作製において、有効に用いることができる。

【0028】

(II) 本発明のポリヌクレオチド、発現ベクターおよび形質転換細胞

本発明はまた、前記本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき容易に製造することができる。具体的には、通常のDNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

【0029】

このような本発明のポリヌクレオチドとしては、以下に示すポリヌクレオチドが例示される：

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3) を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：4) を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：5) を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：6) を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7) を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0030】

具体的には、例えば前記(1-3)に記述したような配列番号：3～7のいずれかのアミノ酸配列を有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。より具体的には、例えば配列番号：3～7のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とヘルパーペプチドとを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができ、例えば配列番号：3～7のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上と破傷風毒素由来のヘルパーペプチド（例えばPhe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu；配列番号：8）とを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドや、

配列番号：3～7のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とAla Gln Tyr II e Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu（配列番号：9、Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024）とを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0031】

前記で作製された本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込むことにより、本発明のペプチドを発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

【0032】

例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等のプラスミドベクター、 λ ZAPII、 λ gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

【0033】

前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）等との融合タンパク質として発現する配列が付加されていても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST融合タンパクベクター（pGEX4Tなど）や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター（pcDNA3.1/Myc-Hisなど）、さらにはチオレドキシンおよびHisタグとの融合タン

パク質を発現するベクター (pET32a) などを用いることができる。

【0034】

以上のような本発明のポリヌクレオチドまたはそれを含有する発現ベクターを WO 02/47474 号公報および Int J. Cancer:100, 565-570 (2002) に記述のヒトモデル動物に供すること等により CTL 誘導活性を測定することができる。

本発明のポリヌクレオチドまたはそれを含有する発現ベクターは、例えば、①後述する本発明のペプチドの製造において、②後述する遺伝子治療において、また③後述する抗原提示細胞の作製において、有効に用いることができる。

【0035】

前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E.coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5 α 株、AD494(DE3)株などが挙げられる。また酵母としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、HeLa細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

【0036】

宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社) を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マーカーを含む通常の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。

【0037】

以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のペプチドを製造することができる。得られたポリペプチドは、一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィ

一、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のポリペプチドを、前述のチオレドキシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

【0038】

(III) 本発明の抗体

本発明は、本発明のペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明のペプチドを免疫原とするポリクーナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であっても良い。

本発明の抗体は前記のように本発明のペプチドに特異的に結合するものであれば特に制限されないが、具体的には、配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を挙げることができる。

【0039】

これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12～11.13, Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. 編, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989)。

【0040】

具体的には、本発明のペプチド（例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を免疫原として用い、家兔等の非ヒト動物を免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明のペプチド（例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）をマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4～11.11)。

【0041】

本発明のペプチドに対する抗体の作製は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うことができる。そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、フルロニックポリオル、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG（カルメットーゲラン桿菌）やコリネバクテリウム-パルヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

【0042】

以上のように本発明のペプチドを用いて常法により適宜動物を免疫することにより、ペプチドを認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノプロット法、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（ELISA）、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。このような免疫学的診断は、WT1遺伝子が発現している癌、すなわち胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の診断において有効である。

【0043】

(IV) 本発明の抗原提示細胞

本発明は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞を提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド投与によりCTL誘導活性が認められたが、これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この複合体の提示された細胞を特異的に認識するCTLが誘導されたことを示すものである。このような、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞は、後述する細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

【0044】

本発明の抗原提示細胞は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞であれば良く、具体的には、例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が樹状細胞の細胞表面に提示された抗原提示細胞を挙げることができる。

【0045】

細胞療法（DC療法）において用いられる抗原提示細胞は、癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、この細胞に本発明のペプチドを体外でパルスするか、または本発明のポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターを細胞内に導入して、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を細胞表面に提示させることにより作製される。ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示可能なHLA-A24抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、抗原提示能が高いとされている樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞にパルスされるものとしては、本発明のペプチドであっても良いし、また本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターであっても良い。

【0046】

本発明の抗原提示細胞は、例えば癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明のペプチド（例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を体外でパルスし、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を作製することにより得られる（Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158:p1796, 1997、Cancer Res., 59:p1184, 1999）。樹状細胞を用いる場合は、例えば、癌患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

【0047】

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば配列番号：3～7のいずれかに記載の配列を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド）あるいはそれを含有する発現ベクターを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該ポリヌクレオチドがDNAの場合は Cancer Res., 56:p5672, 1996や J. Immunol., 161: p5607, 1998などを参考にして行うことができる。また、DNAのみならずRNAの形態でも同様に抗原提示細胞を調製することができ、この場合は、 J. Exp. Med., 184: p465, 1996などを参考できる。

以上のようにして作製された本発明の抗原提示細胞は、後述するCTLの誘導剤、癌ワクチンの有効成分として、細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

【0048】

(V) 本発明のCTL

本発明は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTLを提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド投与によりCTL誘導活性が認められた。これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この複合体の提示された細胞を特異的に認識するCTLが誘導されたことを示すものである。このような、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLは、後述する養子免疫療法において有効に用いられる。

【0049】

本発明のCTLは、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を特異的に認識するものであれば良いが、具体的には、例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を特異的に認識するCTLを挙げることができる。

【0050】

養子免疫療法において用いられるCTLは、患者の末梢血リンパ球を単離し、これを本発明のペプチド（例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配

列からなる癌抗原ペプチド)、あるいは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば配列番号：3～7のいずれかに記載の配列を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド)やそれを含有する発現ベクターでイン・ビトロで刺激する等により作製される(Journal of Experimental Medicine 1999, 190: 1669)。

【0051】

以上のようにして作製された本発明のCTLは、癌ワクチンの有効成分として、養子免疫療法において有効に用いられる。

【0052】

(VI) 癌ワクチンとしての医薬組成物

以上に記載した本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明の発現ベクター、本発明の抗原提示細胞、および本発明のCTLは、それぞれの物質に応じた適切な形態とすることにより、CTLの誘導剤、すなわち癌ワクチンの有効成分とすることができる。以下、具体的に説明する。

【0053】

(6-1) 本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチン

本発明のペプチドは、CTLの誘導能を有するものであり、誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗癌作用を発揮することができる。従って本発明のペプチドは、癌の治療または予防のための癌ワクチンの有効成分とすることができます。すなわち本発明は、本発明のペプチドを有効成分として含有する癌ワクチン(癌ワクチンとしての医薬組成物)を提供する。本発明の癌ワクチンをHLA-A24陽性かつWT1陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-A24抗原にペプチド(例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド)が提示され、提示されたHLA-A24抗原複合体特異的CTLが増殖して癌細胞を破壊することができ、従って、癌の治療または予防が可能となる。本発明の癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

よって、本発明は別の態様として、本発明の癌ワクチンの有効量をHLA-A24陽性かつWT1陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

【0054】

本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、単一のCTLエピトープ（例えば配列番号：3～7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を有効成分とするものであっても、また他のペプチド（CTLエピトープやヘルパーエピトープ）と連結したエピトープペプチドを有効成分とするものであっても良い。すなわち近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドが、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結した約30merのエピトープペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることも示されている。このようなエピトープペプチドの形態で投与した場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。このようにして癌の治療または予防が達成される。

【0055】

また本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、サイトカイン、植物由来成分、海洋生物由来成分、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、フルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルジョン製剤）などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径

数 μ m のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。

【0056】

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0057】

(6-2) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、または発現ベクターを有効成分とするDNAワクチン

前記本発明のペプチドのみならず、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそれを含有する発現ベクターもまた、癌の治療または予防のためのDNAワクチンの有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、または当該ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分として含有する癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。また、本発明は別の態様として、本発明のDNAワクチンの有効量をHLA-A24陽性かつWT1陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

【0058】

近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、in vivoで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープを連結したエピトープペプチドをコードするDNA（ミニジーン）が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。

【0059】

従って、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを1種または2種以上連結させることにより、また場合によっては他のペプチドをコードするポリヌクレオチドも連結させることにより作製されたポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、癌ワクチンの有効成分とすることができる。

【0060】

本発明のポリヌクレオチドを癌ワクチン（DNAワクチン）の有効成分として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

すなわち、本発明のポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊、12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

【0061】

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

【0062】

本発明のポリヌクレオチドを実際に医薬として作用させるには、当該ポリヌクレオチドを直接体内に導入する in vivo法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す ex vivo法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊、12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等）。in vivo法がより好ましい。

【0063】

in vivo法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。in vivo法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のポリヌクレオチドを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のポリヌクレオチドを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができます。

製剤中の本発明のポリヌクレオチドの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のポリヌクレオチドを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0064】

以上のような本発明のポリヌクレオチドの癌患者への投与により、抗原提示細胞内で当該ポリヌクレオチドに対応するポリペプチドが高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた個々の癌抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。以上のようにして、癌の治療または予防が達成される。本発明のポリヌクレオチドまたは当該ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

【0065】

（6-3）本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンを提供する。

近年、癌患者の末梢血からリンパ球を分離し、その中から樹状細胞を誘導し、

イン・ビトロでペプチド等をパルスして調製した抗原提示細胞を皮下投与などにより患者に戻す細胞療法（DC療法）が報告されている（Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158:p1796, 1997、Cancer Res., 59:p1184, 1999、Cancer Res., 56:p5672, 1996、J. Immunol., 161: p5607, 1998、J. Exp. Med., 184: p 465, 1996）。従って前記本発明の抗原提示細胞を、細胞療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

【0066】

本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量は、前記文献記載の投与量が例示される。

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、HLA-A24陽性かつWT1陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、癌を治療または予防することができる。本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

【0067】

(6-4) 本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。本発明のCTLは、以下の養子免疫療法において有効に用いられる。

【0068】

メラノーマにおいて、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養し、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている（J. Natl. Cancer. Inst., 86: 1159, 1994）。またマウスのメラノーマでは、脾細胞をイン・ビトロで癌抗原ペプチドT R P-2で刺激し、癌抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められ

ている（J. Exp. Med., 185:453, 1997）。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と癌抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のペプチドあるいは本発明のポリヌクレオチドや発現ベクターを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して癌特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。従って前記本発明のCTLを、養子免疫療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

【0069】

本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量としては、前記文献記載の投与量が例示される。

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、HLA-A24陽性かつWT1陽性の患者の体内でCTLによる癌細胞の傷害作用が促進され、癌細胞を破壊することにより、癌を治療することができる。本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

【0070】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0071】

実施例 1

システィン残基置換型ペプチドによるCTL誘導活性

WT1のアミノ酸配列（配列番号：1）の第235位-243位よりなるペプチド（WT1₂₃₅₋₂₄₃）の第2位のメチオニンをチロシンに置換したペプチドAの第1位のシスティン残基をセリン残基、アラニン残基、 α -アミノ酪酸、アルギニン残基ま

たはリジン残基に置換した置換型ペプチド（ペプチドB、C、D、E、F）を合成し、イン・ビボでの免疫原性を検討した。以下に、置換前のペプチドA（非置換型ペプチドとも言う）および置換型ペプチドB～Fのアミノ酸配列を示す。

【0072】

ペプチドA：Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu（配列番号：2）

ペプチドB：Ser-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu（配列番号：3）

ペプチドC：Ala-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu（配列番号：4）

ペプチドD：Abu-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu（配列番号：5）

ペプチドE：Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：6）

ペプチドF：Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：7）

【0073】

イン・ビボでの免疫原性の検討は、HLA-A2402/K^bトランスジェニックマウスを用いて行った。当該トランスジェニックマウスの作製およびイン・ビボ免疫原性の測定については、WO 02/47474号公報およびInt J. Cancer: 100, 565-570 (2002) に詳細に記述されており、当該文献に記載の方法に準じて実施した。

【0074】

1) ペプチドの薬剤調製と投与

前記非置換型ペプチドおよび置換型ペプチドはFmoc法により合成した。各合成ペプチドをそれぞれ4.0mg/mlにDMSOにて調整し、さらに滅菌水で2.4mg/mlにそれぞれ希釈した。次に、ガラスシリringeを用いて、1.27倍量のフロイントの不完全アジュバント（ISA51）と混合することによりwater-in-oilエマルションを作製し、200μlの当該薬剤をHLA-A2402/K^bトランスジェニックマウスの尾底部の皮下に免疫した。

【0075】

2) 脾細胞の調製

免疫7日後に脾臓を摘出し、スライドガラスのフロスト部分にて擦り破壊し、脾細胞を回収・調製した。ACKバッファー（0.15M NH₄Cl、10mM KHCO₃、0.1mM EDTA, pH7.2-7.4）にて溶血処理した脾細胞の一部に前記抗原ペプチド薬剤を1

0.0 μ g/m¹で1時間パルスし、7×10⁵個/wellで24穴プレートに播種した。このとき、ペプチド非パルスの7×10⁶個/wellの脾細胞を同時に加えて37℃下で5-6日間イン・ビトロで刺激培養した。この際の培地として、RPMI-1640培地に10%FCS、10mM HEPES、20mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、1mM MEM非必須アミノ酸、1%MEMビタミン、55 μ M 2-メルカプトエタノールを加えたものを用いた。

【0076】

3) 細胞傷害性試験

常法に従って細胞傷害性試験を行った。標的細胞(T)として、EL-4細胞(大日本製薬株式会社、カタログNo.06-039)にHLA-A2402/K^bをコードする遺伝子発現ベクターを導入して得られたEL4-A2402/K^b細胞、および当該EL4-A2402/K^b細胞にペプチドA、B、C、D、EまたはFをパルスした細胞を用いた。なおEL4-A2402/K^b細胞は、WO 02/47474号公報に記載のJurkat-A2402/K^b細胞と同様にして調製した。

これらの細胞は3.7MBq/10⁶個で⁵¹Crラベルし、ペプチドパルスは100 μ g/m¹で1時間実施した(ラベル時間2時間、ラベル開始1時間後にペプチドを添加)。イン・ビトロで刺激培養した脾細胞をエフェクター細胞(E)として標的細胞と各種の比率で混合することにより⁵¹Crリリースアッセイ(J. Immunol 1997; 159:4753)を実施し、エフェクター細胞の傷害活性を測定した。結果を図1-6に示す。縦軸は傷害活性を示し、横軸の値はE/T比を示す。

この図から明らかな通り、ペプチドAの第1位のシステイン残基をセリン残基、アラニン残基、 α -アミノ酪酸、アルギニン残基またはリジン残基に置換したペプチドは、非置換型ペプチドと同等の免疫原性(CTL誘導活性)を有していることが明らかとなった。

【0077】

実施例2

システイン残基置換型ペプチドによる細胞傷害活性

置換型ペプチド(ペプチドB、C、D、E、F)によって誘導されたエフェクター

細胞の非置換型ペプチド（ペプチドA）に対する交差反応性を試験した。ペプチドB、C、D、EまたはFをマウスに免疫することにより誘導されたエフェクター細胞（E）に対して、ペプチドB、C、D、EまたはFをパルス、非置換型ペプチドAをパルス、あるいはペプチド非パルスのEL4-A2402/K^b細胞を標的細胞（T）として作用させ、エフェクター細胞の細胞傷害活性を⁵¹Crリリースアッセイにより測定した。結果を図7～11に示す。

この図から明らかな通り、ペプチドAの第1位のシステイン残基をセリン残基、アラニン残基、 α -アミノ酪酸、アルギニン残基またはリジン残基へ置換したペプチドB～Fで誘導したCTLは、非置換型ペプチドAに交差反応性を示した。

【0078】

【発明の効果】

本発明により、システイン残基を特定のアミノ酸残基に置換した新規なWT1置換型ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはこれらペプチドやポリヌクレオチドを含む癌ワクチンなどが提供される。本発明の癌ワクチンは多くの癌患者を処置することができ、また医薬品としての規格化が容易であるといった利点を有する。

【0079】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Haruo Sugiyama

Chugai Seiyaku Kabushikikaisha

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> WT1-substituted type peptide

<130> 185831

<160> 7

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile

275

280

285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro

290

295

300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys

305

310

315

320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys

325

330

335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro

340

345

350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp

355

360

365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln

370

375

380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr

385

390

395

400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys

405

410

415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val

420

425

430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala

435

440

445

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 2

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 3

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 4

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<223> Xaa at 1 position stands for Abu.

<400> 5

Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 6

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 7

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 8

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 9

Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトWT1由来抗原ペプチド (WT1₂₃₅₋₂₄₃) の第2位をチロシンに置換したペプチドAでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性 (% Specific Lysis) を示し、横軸はE/T比を示す。また黒丸はペプチドAをパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図2】 ペプチドAの第1位のシステインをセリンに置換したペプチドBでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性 (% Specific Lysis) を示し、横軸はE/T比を示す。また黒丸はペプチドBをパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図3】 ペプチドAの第1位のシステインをアラニンに置換したペプチドCでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性 (% Specific Lysis) を示し、横軸はE/T比を示す。また黒丸はペプチドCをパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図4】 ペプチドAの第1位のシステインを α -アミノ酪酸に置換したペプチドDでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性 (% Specific Lysis) を示し、横軸はE/T比を示す。また黒丸はペプチドDをパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図5】 ペプチドAの第1位のシステインをアルギニンに置換したペプチドEでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性 (% Specific Lysis) を示し、横軸はE/T比を示す。また黒丸はペプチドEをパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図6】 ペプチドAの第1位のシステインをリジンに置換したペプチドFでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを

示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性 (% Specific Lysis) を示し、横軸はE/T比を示す。また黒丸はペプチドFをパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図7】 置換型ペプチドBによって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチドAに対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸はCTL誘導活性 (% Specific Lysis) を、また横軸はE/T比を示す。また図中、黒丸はペプチドBをパルスした標的細胞を用いた結果を、黒四角はペプチドAをパルスした標的細胞を用いた結果を、また白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図8】 置換型ペプチドCによって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチドAに対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸はCTL誘導活性 (% Specific Lysis) を、また横軸はE/T比を示す。また図中、黒丸はペプチドCをパルスした標的細胞を用いた結果を、黒四角はペプチドAをパルスした標的細胞を用いた結果を、また白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図9】 置換型ペプチドDによって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチドAに対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸はCTL誘導活性 (% Specific Lysis) を、また横軸はE/T比を示す。また図中、黒丸はペプチドDをパルスした標的細胞を用いた結果を、黒四角はペプチドAをパルスした標的細胞を用いた結果を、また白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

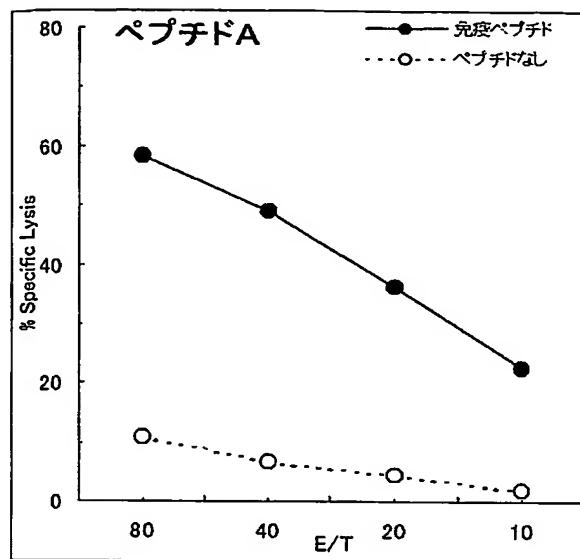
【図10】 置換型ペプチドEによって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチドAに対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸はCTL誘導活性 (% Specific Lysis) を、また横軸はE/T比を示す。また図中、黒丸はペプチドEをパルスした標的細胞を用いた結果を、黒四角はペプチドAをパルスした標的細胞を用いた結果を、また白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【図11】 置換型ペプチドFによって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチドAに対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中

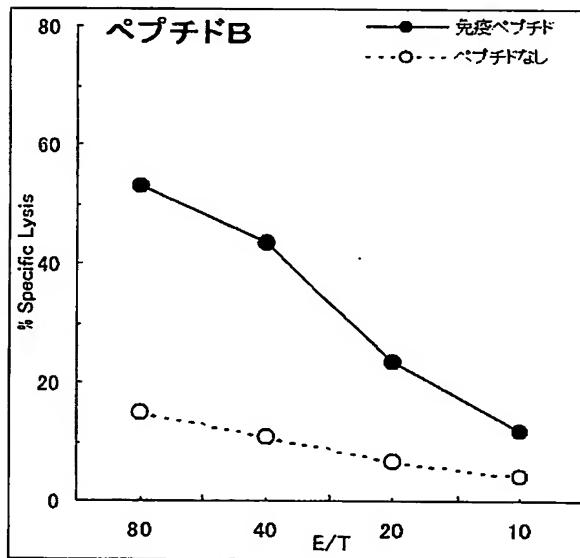
、縦軸はCTL誘導活性 (% Specific Lysis) を、また横軸はE/T比を示す。また図中、黒丸はペプチドFをパルスした標的細胞を用いた結果を、黒四角はペプチドAをパルスした標的細胞を用いた結果を、また白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

【書類名】 図面

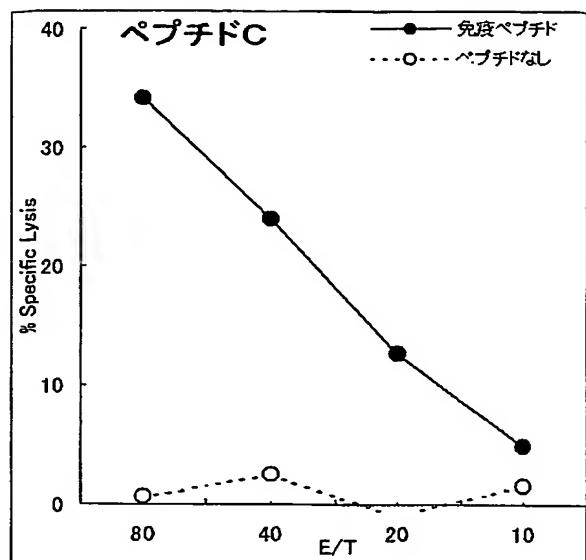
【図1】



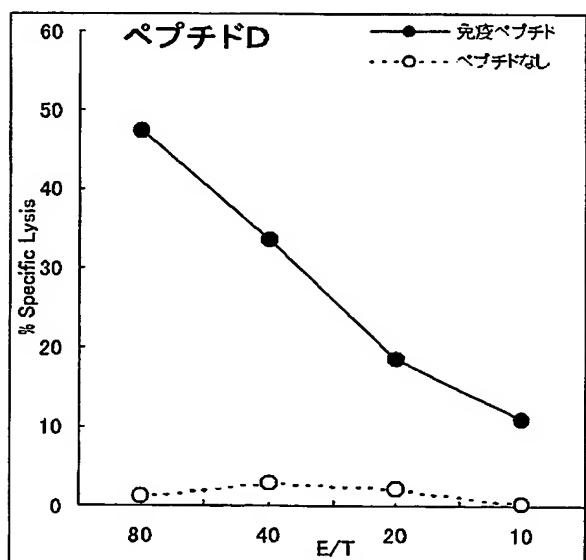
【図2】



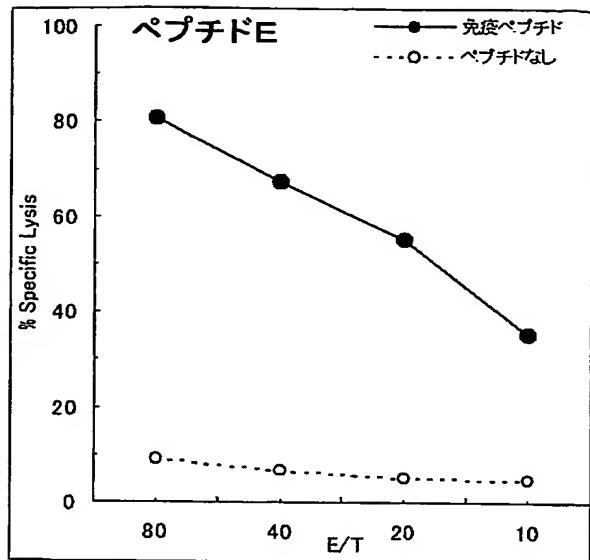
【図3】



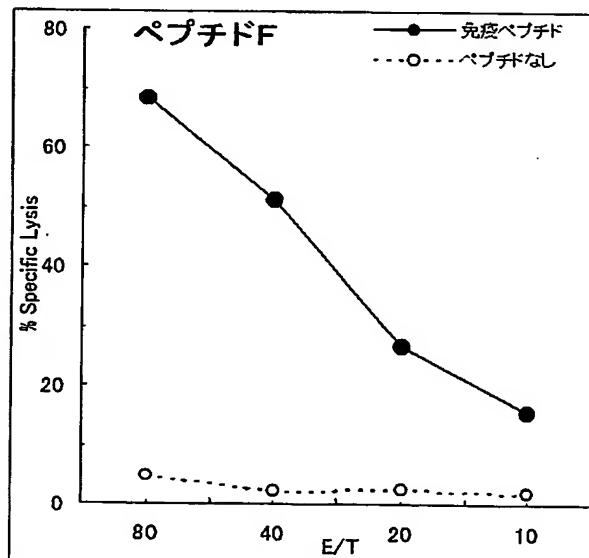
【図4】



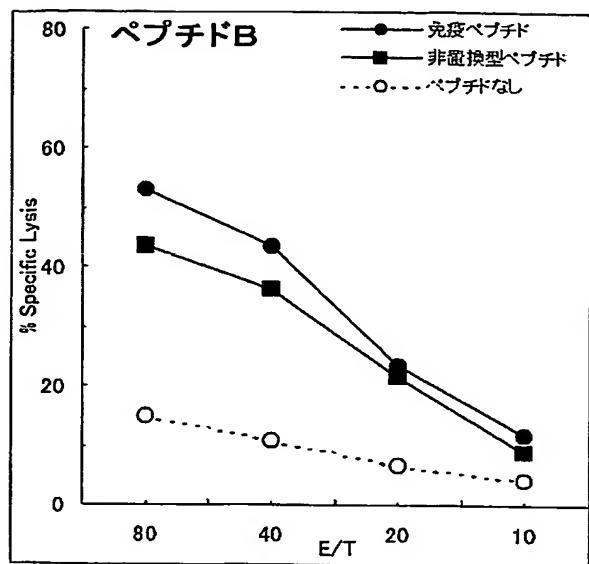
【図5】



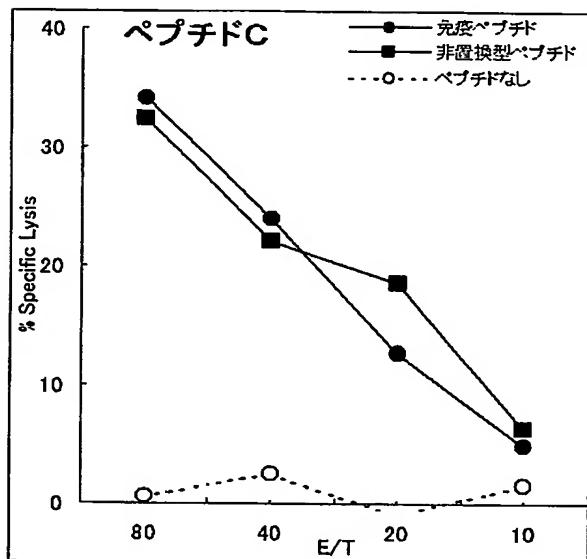
【図6】



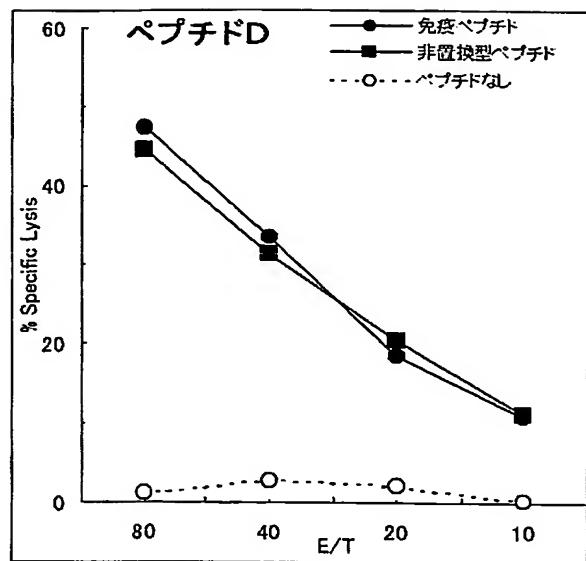
【図7】



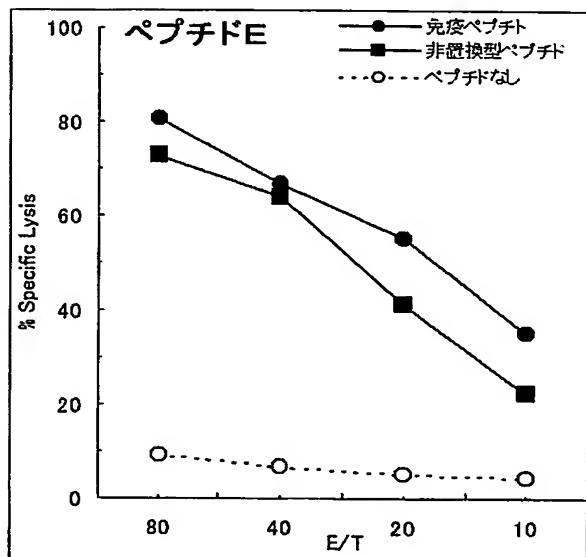
【図8】



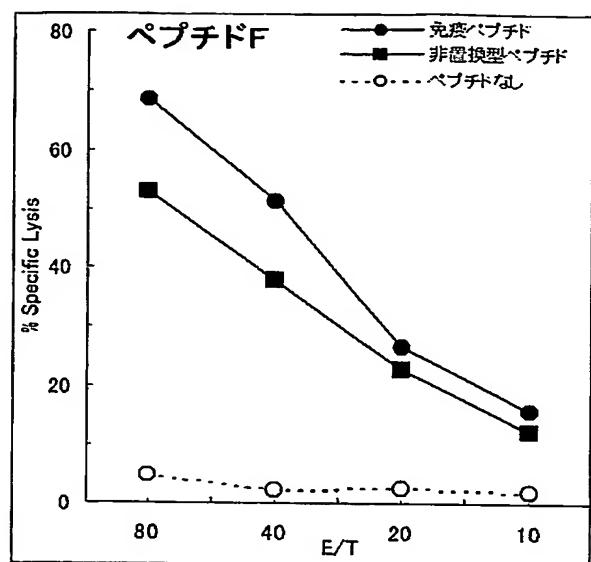
【図9】



【図10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 システイン残基を特定のアミノ酸残基に置換した新規なWT1置換型ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはこれらペプチドやポリヌクレオチドをin vivoまたはin vitroで利用した癌ワクチンなどを提供すること。

【解決手段】 配列番号：3～7のいずれかに記載の配列を含むアミノ酸配列を有するペプチド、前記ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および当該ペプチドやポリヌクレオチド等を有効成分として含有する癌ワクチン等。

【選択図】 なし

特願2002-275264

出願人履歴情報

識別番号 [595090392]

1. 変更年月日 1995年 6月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府箕面市船場西2-19-30

氏名 杉山 治夫

特願 2002-275264

出願人履歴情報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏名 中外製薬株式会社

特願 2002-275264

出願人履歴情報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

[変更理由]

1990年 8月 9日

新規登録

住所
氏名
大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
住友製薬株式会社